

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

---

Študijní program: Chemie  
Študijní odbor: Medicinální chemie



Sára Alušicová

Vývoj ultra-vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie pre stanovenie rifampicínu

Development of an ultra-high performance liquid chromatography for rifampicin  
determination

Bakalárska práca

Vedúci bakalárskej práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Praha, 2019

**Prehlásenie:**

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, dňa 14.5.2019

## Abstrakt

V tejto bakalárskej práci bola vyvinutá ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografická metóda (UHPLC) na stanovenie rifampicínu vo fosfátovom tlmivom roztoku (taktiež nazývaný PBS). Rifampicín je baktericídne antibiotikum zo skupiny rifamycínov, ktorý hrá dôležitú úlohu pri liečbe tuberkulózy. Optimalizované podmienky k stanoveniu rifampicínu v PBS boli nasledujúce: kolóna kinetex UHPLC C18 100A (50x2,1 mm; 1,3 $\mu$ m), mobilná fáza sa skladala z 10mM vodného roztoku pufru mravčanu amónneho (o pH 3,51), do ktorého bola pridaná kyselina trifluóoctová ako iontopárové činidlo, tak aby finálna koncentrácia odpovedala 0,1% (zložka A) a z ACN (zložka B). Meranie prebiehalo v režime gradientovej elúcie mobilnej fázy (čas: 0-1-6-7-8-11, zložka B: 30,30,80,80,30,30). Prietoková rýchlosť bola 0,300 ml/min pri teplote kolóny 30 °C. Dávkovaný objem bol 5 $\mu$ l. Za týchto optimalizovaných UHPLC podmienok bola zostrojená kalibračná závislosť plôch pík na koncentrácií analytu v rozmedzí  $28,3 \cdot 10^{-3}$  -  $4,42 \cdot 10^{-4}$  mg ml<sup>-1</sup>. Hodnota medze detekcie odpovedala  $1,05 \cdot 10^{-4}$  mg ml<sup>-1</sup> a medze kvantifikácie  $3,5 \cdot 10^{-4}$  mg ml<sup>-1</sup>.

## Kľúčové slová

antibiotikum, rifampicín, UHPLC

## Abstract

In this bachelor thesis, an ultra-high-performance liquid chromatography method (UHPLC) was developed to determine rifampicin in phosphate buffer (also called PBS). Rifampicin is a bactericidal antibiotic from the rifamycin family, which plays an important role in the treatment of tuberculosis. Optimized conditions for rifampicin determination in PBS were as follows: column kinetex UHPLC C18 100A (50x2.1 mm; 1.3  $\mu\text{m}$ ), mobile phase consisted of 10 mM aqueous ammonium formate buffer (pH 3.51) to which trifluoroacetic acid was added as an ion pairing agent (to a final concentration of 0.1%) (component A) and of ACN (component B). The measurement was carried out in the gradient elution mode of the mobile phase (time: 0-1-6-7-8-11, component B: 30,30,80,80,30,30). The flow rate was 0.300 ml / min at a column temperature of 30 ° C. The injection volume was 5  $\mu\text{l}$ . Under these optimized UHPLC conditions, a calibration dependence was measured in concentration range from  $28,3 \cdot 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$  to  $4,42 \cdot 10^{-4} \text{ mg ml}^{-1}$ . The limit of detection was  $1,05 \cdot 10^{-4} \text{ mg ml}^{-1}$  and the limit of quantification was  $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mg ml}^{-1}$ .

**Keywords:** antibiotic, rifampicin, UHPLC

## **Pod'akovanie**

Chcela by som v prvom rade pod'akovať svojmu školiteľovi RNDr. Petrovi Kozlíkovi, PhD. za jeho trpezlivosť a odbornú pomoc pri riešení danej problematiky. A taktiež by som chcela pod'akovať svojej rodine, ktorá ma po celú dobu štúdia podporovala.

## Obsah

<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV.....</b>	<b>6</b>
<b>1. TEORETICKÝ ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
1.1 CIEĽ PRÁCE.....	7
1.2 RIFAMPICÍN.....	7
1.3 TUBERKULÓZA .....	10
1.4 STABILITA RIFAMPICÍNU .....	11
1.5 ULTRA VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRÁFIA .....	12
1.6 METÓDY STANOVENIA RIFAMPICÍNU .....	14
<b>2. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>18</b>
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PRÍSTROJE .....	18
2.1.1 Chemikálie.....	18
2.1.2 Prístroje.....	18
2.2 PRÍPRAVA VZORKOV A KALIBRAČNÍCH ROZTOKOV .....	19
2.2.1 Príprava vzorkov .....	19
2.2.2 Príprava kalibračných roztokov.....	19
2.3 CHROMATOGRAFICKÉ PODMIENKY .....	20
<b>3. VÝSLEDKY A DISKUSIA.....</b>	<b>21</b>
3.1 VÝVOJ METÓDY .....	21
3.1.1 Voľba stacionárnej a mobilnej fáze.....	21
3.1.2 Kalibračné závislosti.....	30
3.2.2 Medz detekcie a medz kvantifikácie .....	33
<b>4. ZÁVER .....</b>	<b>34</b>

## Zoznam použitých skratiek a symbolov

Skratka	Vysvetlenie
ACN	Acetonitril
AM	Analyzovaný materiál
DNA	Kyselina deoxyribonukleonová ( z anglického deoxyribonucleic acid)
LC	Kvapalinová chromatografia (z anglického liquid chromatography)
LOD	Medz detekcie (z anglického limit of detection)
LOQ	Medz kvantifikácie (z anglického limit of quantification)
MF	Mobilná fáza
MS	Hmotnostná spektrometria (z anglického mass spectrometry)
PBS	Fosfátový tlmivý roztok (z anglického Phosphate Buffered Saline)
RNA	Kyselina ribonukleová (z anglického ribonucleic acid)
RIF	Liečivo rifampicín
SPE	Extrakcia na tuhej fázy (z anglického solih-phase extraction)
SPME	Mikroextrakcia na tuhej fázy (z anglického Solid-phase microextraction)
TBC	Tuberkulóza (z anglického tuberculosis)
TFA	Trifluóroctová kyselina (z anglického trifluoroacetic acid)
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (z anglického ultra-high performance liquid chromatography)
UV	Ultra fialové žiarenie (z anglického ultraviolet radiation)

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Cieľ práce

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo vyvinúť UHPLC metódu na stanovenie rifampicínu v PBS. Optimalizovaná metóda bude použitá ku stanoveniu rifampicínu v PBS pri in vitro testoch, kedy sa bude sledovať uvoľňovanie antibiotika z nového rifampicínom impregnovaného kolagenového krytia na infikované rany vyvíjaného na oddelení klinickej farmagológie a farmácie Všeobecnej fakultnej nemocnice.

## 1.2 Rifampicín

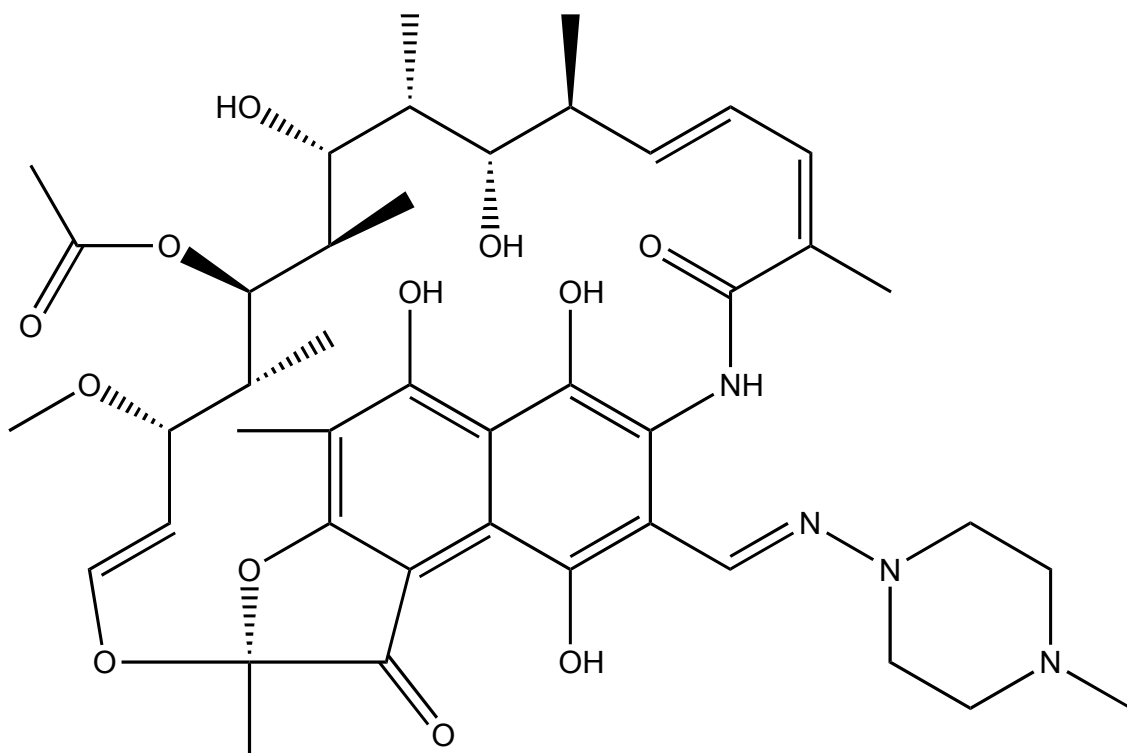
Rifampicín (štruktúra je znázornená na obrázku 1), taktiež známy ako rifampin s molekulovou hmotnosťou 822,953 g/mol a sumárnym vzorcom  $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$  je baktericídne antibiotikum zo skupiny rifamycínov. Jedná sa o polysyntetický derivát rifamicínu B, produkovaným *Streptomyces mediterranei*. [2] Rifampicín je červenooranžový kryštalický prášok, ktorý sa vyznačuje malou rozpustnosťou vo vode (viď tabuľka 1). Na obrázku 1 je vidieť niekoľko funkčných skupín. Hodnoty  $pK_A$  funkčných skupín vo vode podľa dokumentu zverejneného spoločnosťou Sigma Aldrich sú 1,7 pre 4-hydroxylovú skupinu, 7,9 pre 4-piperazínový dusík a 6,7 pre 3- piperazínový dusík. [1]

Rifampicín je dominantným liekom pri liečbe tuberkulózy a iných typov bakteriálnych infekcií. Mechanizmus jeho účinku spočíva v tom, že pôsobí baktericídne tak, že blokuje aktivitu DNA-dependetnej RNA polymerázy. Pôsobí silno baktericídne na mykobaktéria tuberkulózy, atypické mykobaktérie a mykobaktérie lepry. Pôsobí aj na mykobaktérie s nízkou metabolickou aktivitou.

Počas liečby rifampicínom dochádza k selekcií rezistentných kmeňov a preto je potreba ho podávať po stanovení citlivosti (stanovenie citlivosti izolovaných bakteriálnych kmeňov na antibiotiká je nevyhnutnou súčasťou bakteriologickej diagnostiky), krátko v kombinácií s inými antibiotikmi, aby sa rezistencií predišlo.



Rifampicín sa rýchlo vstrebáva z tráviaceho ústroja, takmer v 100%. Vázba na bielkoviny plazmy je asi 75%, polčas eliminácie je asi 5 hodín. Rifampicín dobre preniká do tuberkulózných ložísk, lymfatických uzlín a telesných tekutín. Prechádza aj placentou do materského mlieka. Rifampicín sa metabolizuje v pečeni. Približne 60% perorálne prijatej dávky je vylúčené stolicou a 30% v moči. Nie veľký podiel liečiva je vylúčený slzami, potom aj inými telesnými tekutinami, ktoré sa zafarbujú do oranžova. Medzi najzávažnejšie vedľajšie účinky patrí hepatotoxicita. [3]



Obrázok 1: Štruktúra rifampicínu. Obrázok bol vytvorený v aplikácii ChemDraw.

Tabuľka č.1: Vlastnosti rifampicínu [1]

<i>Molekulový vzorec</i>	<i>CAS</i>	<i>Farba</i>	<i>Rozpustnosť vo vode</i>
C <sub>43</sub> H <sub>58</sub> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub>	13292-46-1	Oranžovo-červená	1400 mg/L (pri 25 °C)

### 1.3 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je jedna z najstarších známych ľudských chorôb a je stále jednou z hlavných príčin mortality – každý rok zomiera približne 2 milióny ľudí na toto ochorenie. TBC má veľa prejavov, ktoré ovplyvňujú kosti, centrálny nervový systém a mnoho ďalších orgánových systémov. Ide ale predovšetkým o pľúcne ochorenie, ktoré je iniciované ukladáním *Mycobacterium tuberculosis* obsiahnutého v aerosolných kvapôčkach na pľúcne alveolárne povrchy. Od tohto bodu môže mať progresia ochorenia niekoľko výstupov, určených prevažne odpoveďou hostiteľského imunitného systému. Účinnosť tejto odpovede je ovplyvnená vnútornými faktormi, ako je genetika imunitného systému, taktiež vonkajšie faktory ako napríklad výživový a fyziologický stav hostiteľa. Okrem toho môže patogén zohrávať úlohu v progresii ochorenia – niektoré kmene *M. Tuberculosis* sú údajne viac virulentné než iné, čo je dokázané zvýšenou prenosnosťou, čo je spojené s vyššou morbiditou a mortalitou u infikovaných jedincov. Napriek rozšírenému používaniu oslabenej živej vakcíny a viacerých antibiotík existuje viac TB ako kedykoľvek predtým, ktoré vyžadujú nové vakcíny a lieky, špecifickejšiu a rýchlejšiu diagnostiku. Výskumníci využívajú informácie získané z kompletnej sekvencie genómu *M. Tuberculosis* a z nových genetických a fyziologických metód, ktoré pomôžu pri vývoji týchto veľmi potrebných antituberkulózných látok. [4]-[6]

## 1.4 Stabilita rifampicínu

Chemická stabilita rifampicínu ako v tuhom stave, tak v rôznych médiách bola široko skúmaná. Zatiaľ čo rifampicín je v pevnom stave značne stabilný, jeho rýchlosť rozkladu je veľmi vysoká v kyslom, ako aj v alkalickom prostredí a boli identifikované rôzne produkty rozkladu. [1]

Výsledky rôznych štúdií ukazujú, že rifampicín degraduje pri rôznych teplotách. Bola študovaná degradácia rifampicínu pri izbovej teplote a taktiež pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Takémuto rozkladu sa dá účinne zabrániť pridaním kyseliny askorbovej, čím sa výrazne stabilita rifampicínu predĺži. [7]

Je známych niekoľko spôsobov degradácie rifampicínu. Rifampicín môže podliehať reverzibilnej hydrolýze za vzniku 3-formylrifamycínu SV. K tejto degradácii dochádza ľahko v prítomnosti atómu vodíka. V prítomnosti kyslíka je rifampicín oxidovaný za vzniku rifampín chinónu. Tieto cesty degradácie rifampicínu by mohli byť prítomné vo vodnom rozpúšťadle s prítomným atmosferickým kyslíkom. [8]

## 1.5 Ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

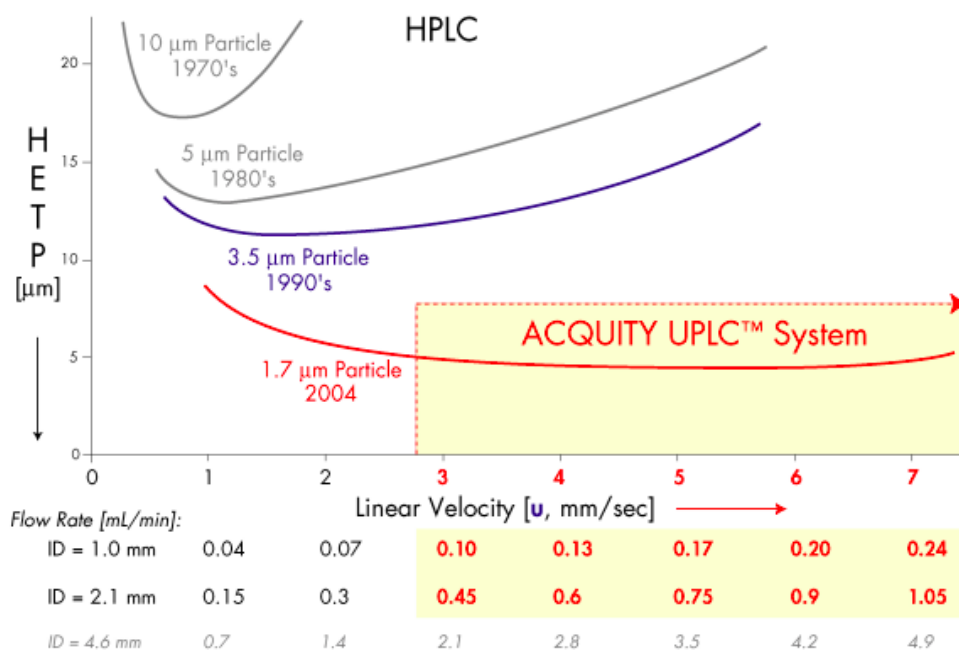
Ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia má rôzne označenie. Používa sa skratka UHPLC aj UPLC. Obidva tieto pojmy označujú chromatografické procesy, ktoré používajú pri analýzach vysoké tlaky (40 MPa a vyššie). UPLC je skratka s ktorou prišla na trh ako prvá firma Waters Corporation. Vyvinula ako prvá komerčne dostupný kvapalinový chromatograf, ktorý bol schopný využívať tlakov až 100 MPa. Tento termín taktiež označuje proces, ktorý okrem vysokých tlakov používa aj špeciálne kolóny naplnené časticami s veľkosťou pod 2  $\mu\text{m}$ . Tým dosahujú rýchlejšiu a citlivejšiu analýzu. Pojem UHPLC je obecnější, ktorý využíva tlakov vyšších než 40 MPa. Ja vo svojej práci používam skratku UHPLC. [9] [10]

UHPLC je pomerne nová metóda v chromatografií. Má niekoľko výhod oproti klasickej HPLC. Medzi výhody patrí určite kratšia doba analýzy, zníženie medze detekcie, zvýšenie separačnej účinnosti a zvýšenie citlivosti. Hlavnou nevýhodou je, že počas analýzy sa vyvíja vysoký tlak, čo vyžaduje väčšiu údržbu a znižuje životnosť kolón, ktoré obsahujú častice väčšie ako 2  $\mu\text{m}$ . [9] [11]

Neoddeliteľnou súčasťou chromatografu je kolóna. Správny výber kolóny má v analýze rozhodujúci význam. Väčšinou sú vyrobené z nerezovej oceli. Kolóna UHPLC je najčastejšie 5-10 cm dlhá a jej vnútorný priemer je najčastejšie 2,1 mm a 1 mm. Rozmery kolóny sú jedným z rozdielov oproti HPLC. HPLC kolóny dosahujú dĺžok 10-25 cm s vnútorným priemerom 3-5 mm. [12]

Vysoký tlak za ktorého sú plnené kolóny zaručuje stabilitu častíc sorbentu v tele kolóny. Každá chémia kolóny poskytuje inú kombináciu hydrofobicity, aktivity silanolu, hydrolytické stability a chemickej interakcie s analytmi. Používajú sa sorbenty anorganického (silikagél) a organického typu (polymér, uhlík). Silikagélne sorbenty sú mechanicky odolné a vykazujú pomerne vysokú účinnosť. Ich nevýhodou je, že sú stabilné v mobilných fázach s hodnotou pH 2,00 – 8,00. [14] [15] Polymérne sorbenty naopak môžu pracovať v širšej oblasti pH a nedochádza pri nich k iónovým interakciám. Ich nevýhodou je nižšia mechanická odolnosť a nižšia účinnosť. [13]

Platí, že s klesajúcou veľkosťou častíc vzrastá aj účinnosť separácie. Na obrázku 2 sú znázornené van Deemterové krivky, ktoré odpovedajú daným veľkostiam častíc sorbentov. Minimum krivky odpovedá vyššej separačnej účinnosti kolóny, kedy sú hodnoty výškového ekvivalentu teoretickej priehradky najnižšie. Pri veľkosti častíc 1,7  $\mu\text{m}$  má minimum krivky pomerne široký rozsah. Vďaka tomu je možné pracovať v širšom rozsahu hodnôt prietoku bez toho aby bola negatívne ovplyvnená účinnosť. [16]-[20]



Obrázok 2: van Deemterove krivky pri rôznych veľkostiach častíc [21]

## 1.6 Metódy stanovenia rifampicínu

Doposiaľ bolo zrealizovaných a predstavených niekoľko rôznych metód, ktoré sa zaoberali analýzou rifampicínu a jeho stanovením v rôznych matriciach. Väčšina z týchto metód využíva ako analyzovaný materiál rôzne fyziologické tekutiny ako je napríklad ľudské sérum, moč alebo plazmu. Medzi najčastejšie metódy stanovenia rifampicínu patrí rýchla a efektívna LC/MS metóda. Táto metóda je vhodná pre farmakokinetické, biologické ale aj bioekvivalenčné štúdie rifampicínu. Druhou najčastejšou metódou sú spektrofotometrické metódy a HPLC, poprípade UHPLC metódy.

### Úprava vzorky

Medzi prvú najčastejšiu metódu úpravy vzorky patrí kvapalinová extrakcia ľudskej plazmy a moču. Táto technika je založená na prechode rifampicínu z jednej kvapalnej fáze do druhej. Vzorka sa vo väčšine prípadov zmiešala s ľadovo studeným acetonitrilom (v pomere 1:3) alebo zmesou acetonitrilu s metanolom a následne bola zmes filtrovaná. [22] [23] Alebo sa ľudská plazma zmiešala s organickým rozpúšťadlom aby sa umožnilo vyzrážanie proteínu a potom nasledovala centrifugácia po dobu 10 minút aby sa vzniknuté zrazeniny odstránili. [24] [25]

Druhou najčastejšou metódou úpravy vzorky je extrakcia na pevnej fáze (SPE). Táto metóda má oproti kvapalinovej extrakcii viacero výhod. K významným výhodám patrí efektívnejšie zakoncentrovanie vzorky, lepšia selektivita, špecifita a opakovateľnosť. Pri tejto extrakcii je rifampicín sorbovaný na tuhú fázu z ľudskej plazmy. Interakcia rifampicínu musí byť silnejšia k tuhej fáze než ku kvapalnej, v ktorej je rifampicín rozpustený. [26]

Ďalšou veľmi častou úpravou vzorky rifampicínu bola mikroextrakcie na pevnej fáze (SPME). Táto technika na rozdiel od SPE pracuje s veľmi malými objemami. Ako extrakčný materiál sa najčastejšie používajú materiály na bázy silikagélu (C18, C8, C2). Táto technika je presnejšia, citlivejšia a znižuje sa čas prípravy vzorky.

Taktiež jedným z možných úprav vzorky rifmapicínu (RIF zakúpený ako tableta) bolo rozpustenie vo vhodnom rozpúšťadle. Medzi najčastejšie rozpúšťadlá patrí acetonitril alebo metanol a taktiež sa pridáva kyselina askorbová ako antioxidačné činidlo. [27]-[29]

V nasledujúcich tabuľkách (tabuľky 2,3) sú zobrazené publikované metódy, ktoré sú zamerané na účinnú separáciu rifampicínu spojenú s vývojom optimálnej HPLC alebo UHPLC metódy. Najčastejšie prebiehala separácia na reverzných fázach s použitím MS detekcie. Najčastejšou zložkou mobilnej fáze bol methanol, acetonitril a fosfátový tlmivý roztok v rôznych pomeroch. Najčastejšie sa používala stacionárna fáza C18. O tieto nižšie uvedené informácie som sa mohla pri stanovovaní rifampicínu opierať.



Tabuľka 2: Prehľad vybraných metód pre stanovenie rifampicínu

AM	Prietok (ml/min)	MF	Kolóna	Detektor/ Vlnová dĺžka	Dávkovaný objem (µl)	LOQ µg/ml	Lit.
Ľudská plazma	0,35	ACN (+HCOOH) (0,05%, v/v) a 15mM tlmivý roztok NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> (pH 5) Pri gradientovej elúcii (čas: 1-2-3-4-5-6, ACN: 35-50-65-95-35-35)	Hypersil Hypurity C18 kolóna (150 mm×2.1mm 5 µm)	MS	50	0,025	[30]
Ľudská plazma	-	0,1 % HCOOH vo vode a ACN pri gradientovej elúcii (čas: 0-0,25-0,5-1-1,25- 1,5-1,9-2,0 ACN: 30-35-45-55-65- 95-30-30)	Kinetex C18 (50x2,1 mm, 2,6 µm)	MS	1	2,4	[23]
Tableta	2	MeOH, ACN, K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (0,075M) a kys. citrónová (1M) (28:30:38:4,v/v)	Kromasil C18 (150mmx 4,6mmx5 µm)	MS	10	1	[31]
Plazma, moč	1,2	PBS (pH 2,6) (0,05M) a ACN (55:45,v/v)	LUNA C18 (250x4,6mm, 5 µm)	DAD / 254 nm	20	0,1	[28]

Tabuľka 3: Prehľad vybraných metód pre stanovenie rifampicínu

AM	Prietok (ml/min)	MF	Kolóna	Detektor/ Vlnová dĺžka	Dávkovaný objem (μl)	LOQ μg/mL	Lit.
Ľudská plazma	0,5	MeOH-pufr K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,00, 0,02M) (75:25, v/v)	LUNA C18 (250x4,6mm, 5 μm)	UV spektrofotometer. / 339 nm	100	0,31	[24]
Ľudská plazma	1	Voda-MeOH (5% MeOH v/v po dobu 5 minút, 100% H <sub>2</sub> O po dobu 15 minút)	Zorbax C18 (250x4,6, 5 μm)	UV spektrofotometer / 333,6 nm	20	-	[26]
Tableta	1	MeOH-ACN-voda (pH 4,8) (60:20:20, v/v)	Kromasil C18 (250x4,6nm, 5 μm)	UV spektrofotometer / 254 nm	20	1,75	[27]
Krv	0,5	Tlmivý roztok CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 4,5, 50mM) – ACN – MeOH (40:30:30, v/v)	C8 Waters, Sunfire (250x4.6mm, 5μm)	UV-Vis detektor / 261 nm	20	1.0	[22]

## 2. Experimentálna časť

### 2.1 Použité chemikálie a prístroje

#### 2.1.1 Chemikálie

Acetonitril CHROMASOLV<sup>®</sup>, for HPLC, gradient grade  $\geq 99,9\%$ , Honeywell, FR

Methanol, CHROMASOLV<sup>®</sup>, for HPLC, gradient grade  $\geq 99,9\%$ , Honeywell, FR

Kyselina trifluoroctová, 99%, Sigma-Aldrich, Nemecko

Kyselina octová, 99% p. a., Lach-Ner, s. r. o. Česká republika

Kyselina askorbová, 99% , Sigma Aldrich, Nemecko

Rifampicin-Natrium, Eremfat

#### 2.1.2 Prístroje

Ultrazvukový sonikátor, Elma, S15 Elmasonic, Nemecko

Analytické váhy, 262 SMA-FR, sartorius, Švajčiarsko

pH meter, JENWAY 3540 pH/conductivity meter, UK

kvapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC H Class (Water, USA)

Automatická pipeta SOCOREX ACURA

## 2.2 Príprava vzorkov a kalibračných roztokov

### 2.2.1 Príprava vzorkov

Rifampicín (25mg) a kyselina askorbová (10mg) boli rozpustené najprv v methanole (25ml) resp. vo fosfátovom tlmivom roztoku, tak aby koncentrácia odpovedala 1 mg/ml. Pripravený roztok bol vždy vložený do ultrazvukovej lázne pre úplne rozpustenie rifampicínu a taktiež kyseliny askorbovej. Takto pripravené roztoky boli uchovávané v ladničke.

### 2.2.2 Príprava kalibračných roztokov

Kalibračné roztoky som pripravila riedením zásobného roztoku rifampicínu. Najkoncentrovanejší roztok som si pripravila navážením 25 mg rifampicínu a rozpustením v roztoku kyseliny askorbovej, ktorý vznikol raz rozpustením kyseliny v methanole a druhýkrát v PBS. Následne som premerala kalibračné roztoky o koncentráciách  $28,3 \cdot 10^{-3}$ ;  $14,1 \cdot 10^{-3}$ ;  $7,06 \cdot 10^{-3}$ ;  $3,53 \cdot 10^{-3}$ ;  $1,77 \cdot 10^{-3}$ ;  $8,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $4,41 \cdot 10^{-4} \text{ mg ml}^{-1}$ .

### 2.3 Chromatografické podmienky

Pri optimalizácii stacionárnej fáze boli vyskúšané dve chromatografické kolóny. Prvá bola vyskúšaná reverná stacionárna fáza C18 Acquity UPLC HSS C18 SB (100x2,1 mm; 1,8  $\mu$ m) a druhá kolóna Kinetex C18 100A (50x2,1 mm; 1,3  $\mu$ m).

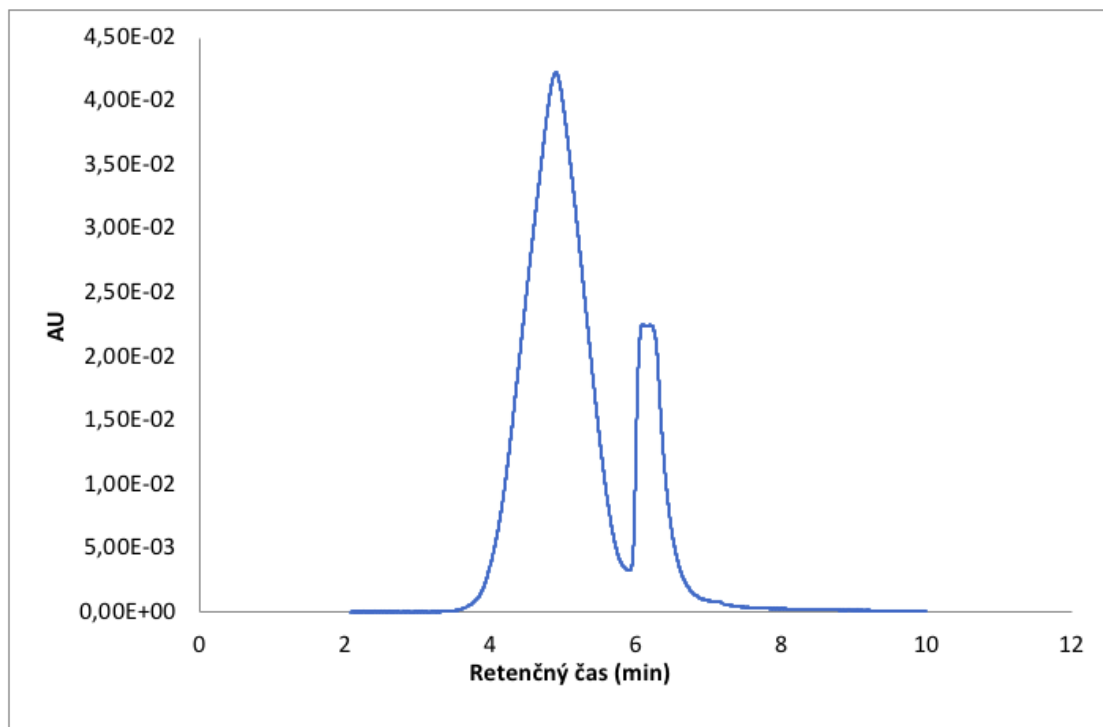
Pri optimalizácii zloženia mobilnej fáze pre stanovenie rifampicínu boli vyskúšané rôzne pomery organického rozpúšťadla (ACN, MeOH)/vodnej zložky a taktiež bol vyskúšaný tlmivý roztok 10mM mravčan amónny s prídavkom a bez prídavku TFA. Tlmivý roztok bol pripravený navážením presného množstva mravčanu amónneho, ktorý bol doplnený vodou, tak aby koncentrácia odpovedala 10 mM. Po upravení pH kyselinou mravčou na hodnotu 3,51 bola do roztoku pridaná kyselina trifluoocetová, tak aby finálna koncentrácia odpovedala 0,1%.

### 3. Výsledky a diskusia

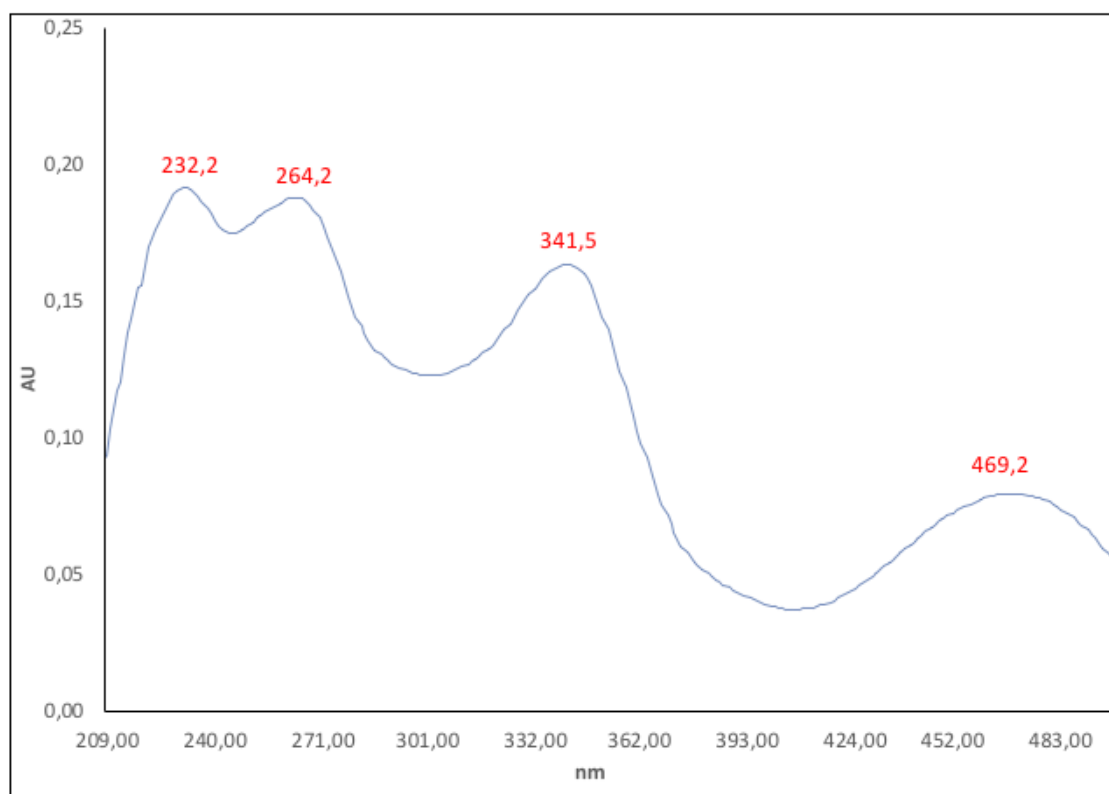
#### 3.1 Vývoj metódy

##### 3.1.1 Voľba stacionárnej a mobilnej fázy

Ná základe literatúry [32] bola testovaná ako prvá C18 stacionárna fáza – Acquity UPLC HSS C18 SB. Bol sledovaný vplyv organického modifikátoru (acetonitrilu a methanolu) na retenčné chovanie rifampicínu. Na obrázku 3 je uvedený chromatogram získaný za prvotných podmienok: dávkovaný objem vzorky 1  $\mu$ l, prietok mobilnej fázy 0,300 ml/min, teplota kolóny 30 °C a teplota autosempleru 15 °C, detekcia bola hodnotená pri vlnovej dĺžke 341 nm, pretože pri tejto vlnovej dĺžke je dosiahnutého lokálneho maxima v UV spektre, ako je patrné z obrázku 4. Mobilná fáza sa skladala z 90% ACN a 10% H<sub>2</sub>O. Ako režim bola zvolená izokratická elúcia. Chromatografický pík bol široký, rozmývajúci sa vzadu. Taktiež je možné vidieť, že nám vyšli dva píky, čo mohlo byť spôsobené tým, že časť molekuly bola v disociovej forme a časť v nedisociovej.



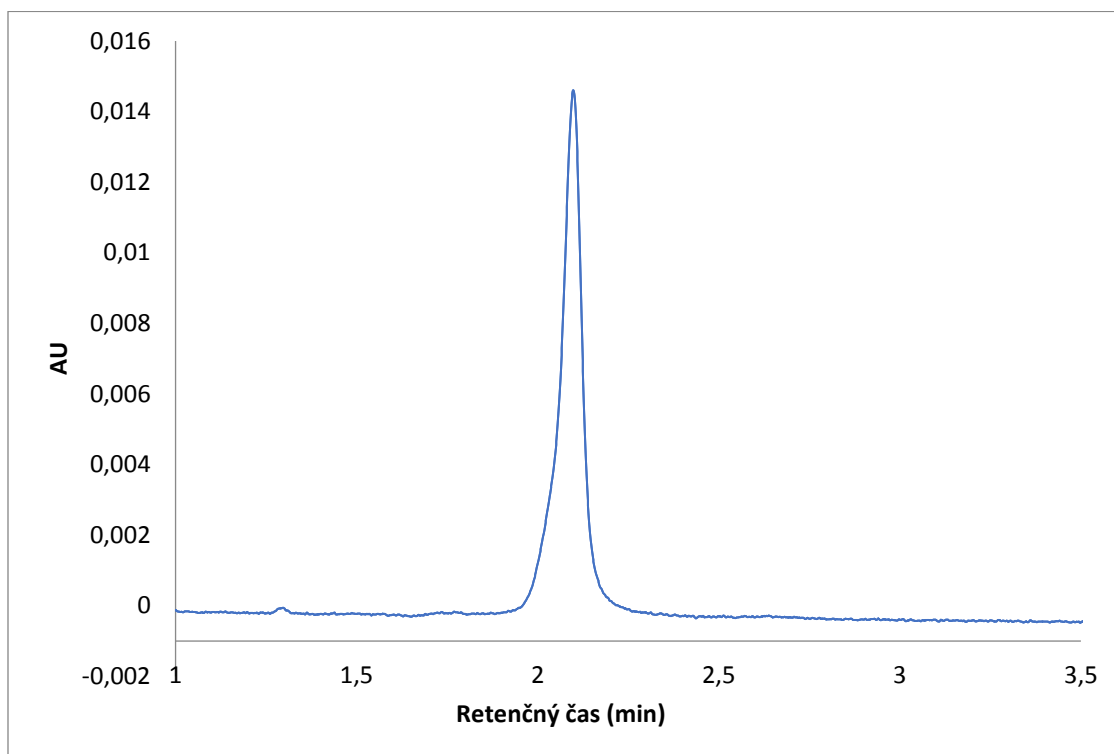
Obrázok 3: Chromatogram rifampicínu pri pomere mobilnej fáze 90% ACN a 10% H<sub>2</sub>O. Kolóna: Acquity UPLC HSS C18 SB (100x2,10 mm;1,8 µm), dávkovaný objem vzorky bol 1 µl, prietok mobilnej fáze bol 0,300 ml/min, teplota kolóny bola 30 °C a teplota autosempleru bola 15 °C, vlnová dĺžka detekcie: 341 nm.



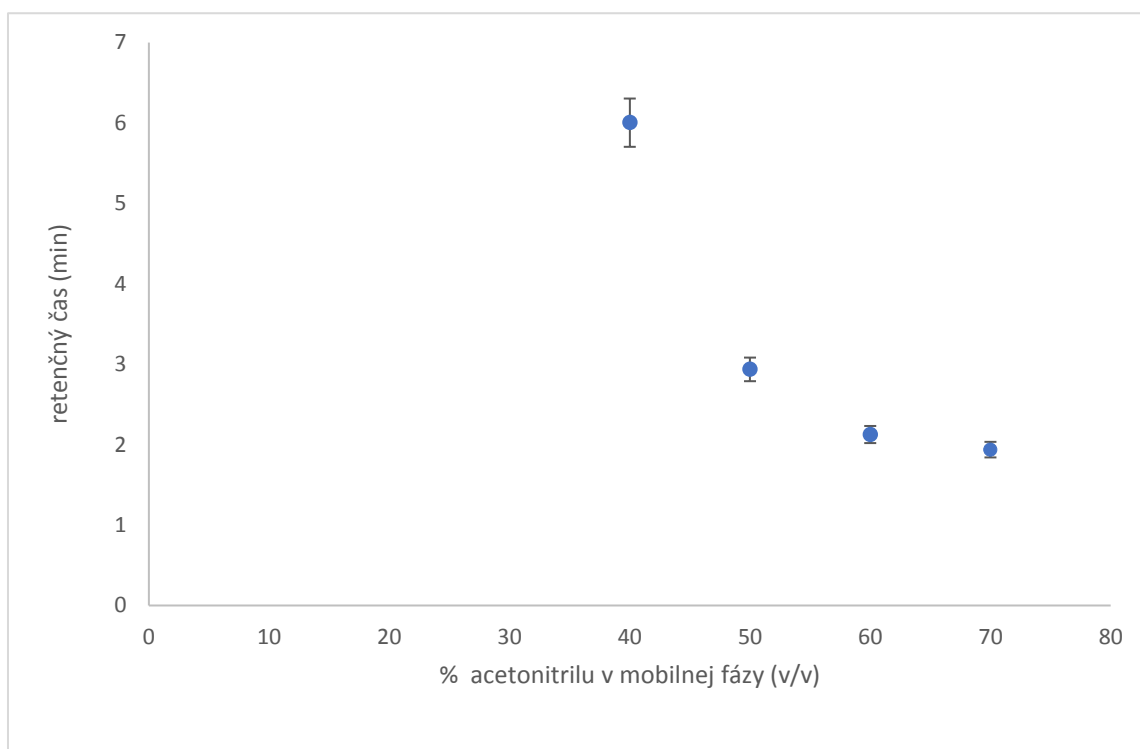
Obrázok 4: UV spektrum



Kôli prevedeniu rifampicínu do jednej iontovej formy bola pridaná do mobilnej fáze 0,1 % kyselina octová. Na obrázku 5 je vidieť chromatogram získaný za daných podmienok: dávkovaný objem vzorky 1  $\mu$ l, prietok mobilnej fáze 0,300 ml/min, teplota kolóny 30°C a teplota autosempleru 15 °C, detekcia bola hodnotená opäť pri vlnovej dĺžke 341 nm. Mobilná fáza sa skladala z 80% ACN a 20% H<sub>2</sub>O s prídavkom 0,1% kyseliny octovej. Pri takýchto podmienkach došlo k zúženiu chromatografického píku, aj keď tvar píku bol stále nesymetrický. Pri tomto zložení mobilnej fáze bol sledovaný vplyv obsahu acetonitrilu na retencií rifampicínu. Závislosť je ukázaná na obrázku 6. Z daného grafu je zrejmé, že so znižujúcim sa obsahom acetonitrilu v mobilnej fázy dochádza k zvýšeniu retencie rifampicínu.

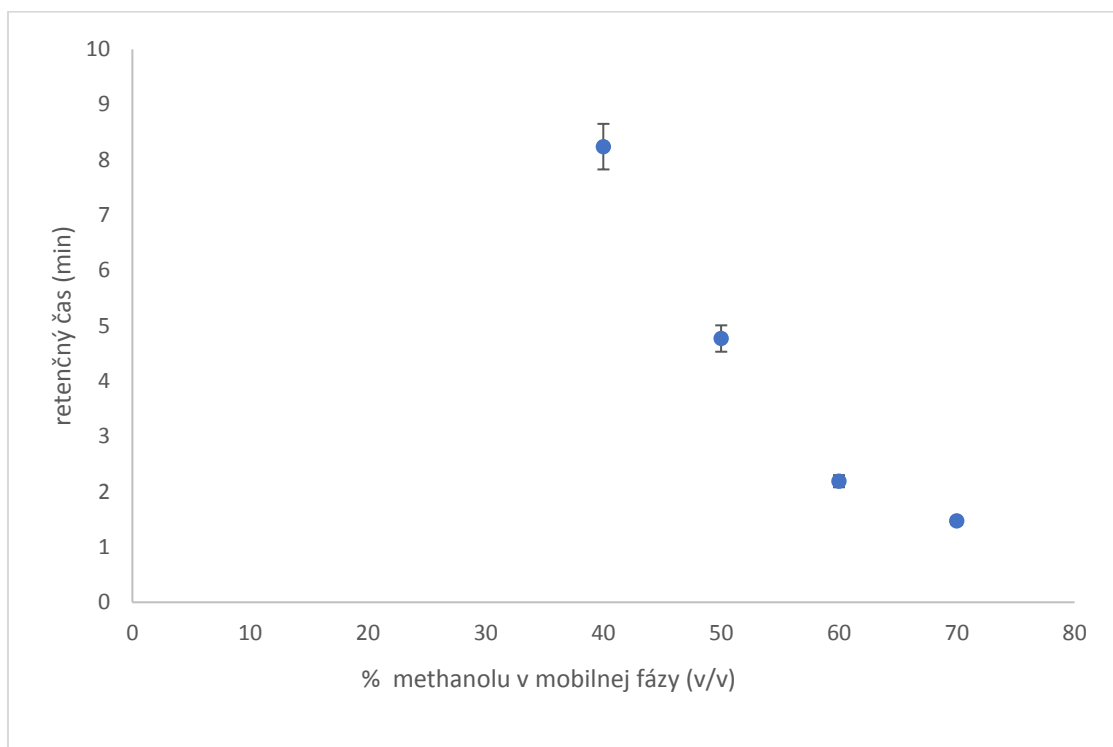


Obrázok 5: Chromatogram rifampicínu pri pomere mobilnej fáze: 80% ACN a 20% H<sub>2</sub>O po prídavku 0,1% kyseliny octovej. Kolóna: Acquity UPLC HSS C18 SB (100x2,10 mm;1,8 µm), dávkovaný objem vzorky bol 1 µl, prietok mobilnej fáze bol 0,300 ml/min, teplota kolóny bola 30 °C a teplota autosampleru bola 15 °C, vlnová dĺžka detekcie: 341 nm.



Obrázok 6: Graf závislosti retenčního času na množstve acetonitrilu

Ako druhý organický modifikátor bol testovaný methanol. Závislosť retencie rifampicínu na obsahu methanolu v mobilnej fáze je znázornený na obrázku 7. Retencia rifampicínu v porovnaní s acetonitrilom bola vyššia, čo je dané nižšou elučnou silou v porovnaní s acetonitrilom v RP chromatografií.



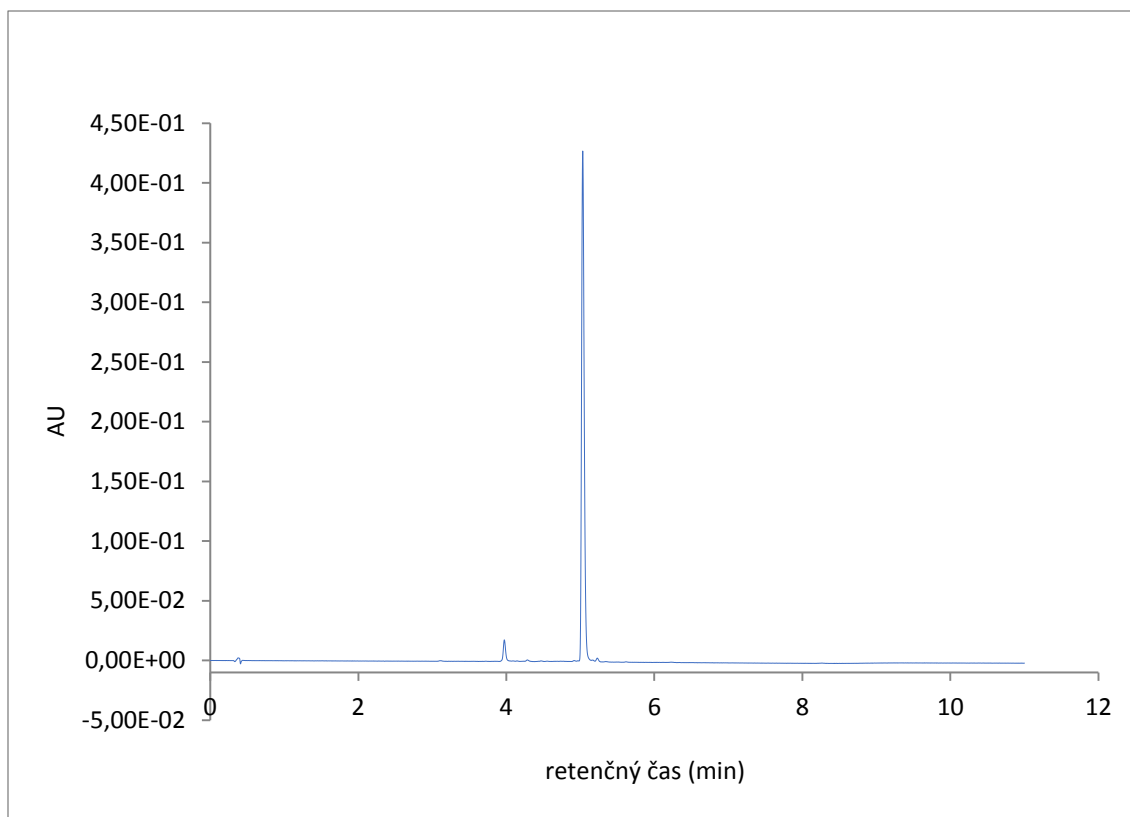
Obrázok 7: Graf závislosti retenčného času na množstve methanolu

## Výsledky získané na kolóne Kinetex C18 100A

Z dôvodu nesymetrického píku bola testovaná kolóna Kinetex C18 100A (50x2,1 mm, 1,3 $\mu$ m). Chromatogram získaný za podmienok: dávkovaný objem vzorky 5 $\mu$ l, prietok mobilnej fáze 0,300 ml/min, teplota kolóny bola 30°C a teplota autosempleru 15 °C, vlnová dĺžka detekcie: 341 nm. Mobilná fáza sa skladala z 80% ACN a 20% H<sub>2</sub>O. Pík bol užší a symetrickejší než na kolóne Acquity, ale stále pomerne dosť široký. Z tohoto dôvodu bola do pufru mravčanu amónneho o pH 3,51 pridaná kyselina tifluóroctová ako iontopárové činidlo. Tým došlo k vytvoreniu menej polárneho iontového asociátu a tým sa zamedzilo nežiadúcim interakciám časti molekuly rifampicínu s funkčnými skupinami kolóny. Prídavok TFA pôsobil priaznivo na tvar, výšku a faktor chvostovania píku. Ďalej bola namiesto izokraticej elúcie použitá gradientová elúcia. Použitý gradient bol nasledujúci: viď tabuľka 4. Chromatogram za optimalizovaných podmienok je zobrazený na obrázku 8.

Tabuľka 4: Použitá gradientová elúcia pre ACN ako zložku B.

Čas	%A	%B
0	70	30
1	70	30
6	20	80
7	20	80
8	70	30
11	70	30

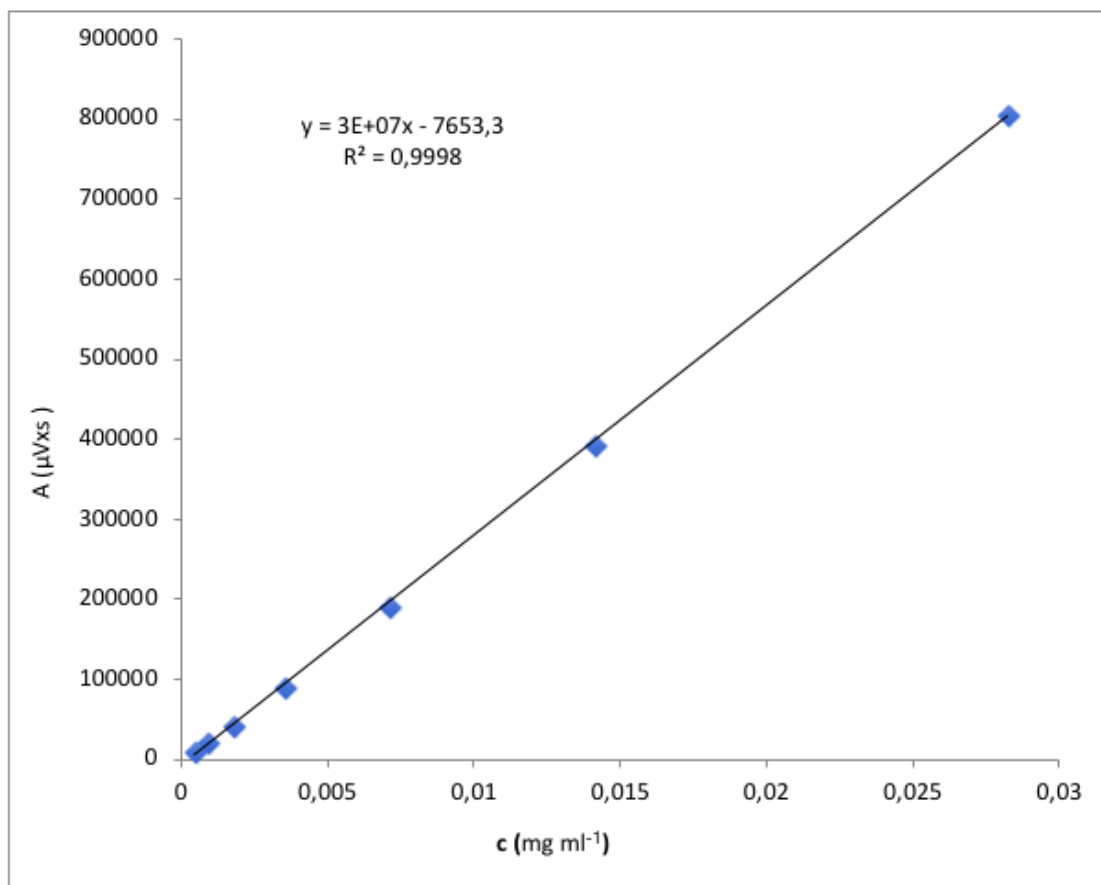


Obrázok 8: Chromatogram rifampicínu pri režime gradientovej elúcie.

Kolóna: Kinetex C18 100A (50x2,1 mm; 1,3 $\mu$ m), dávkovaný objem vzorky bol 5 $\mu$ l, prietok mobilnej fáze bol 0,300 ml/min, teplota kolóny bola 30°C a teplota autosempleru bola 15 °C, vlnová dĺžka detekcie: 341 nm.

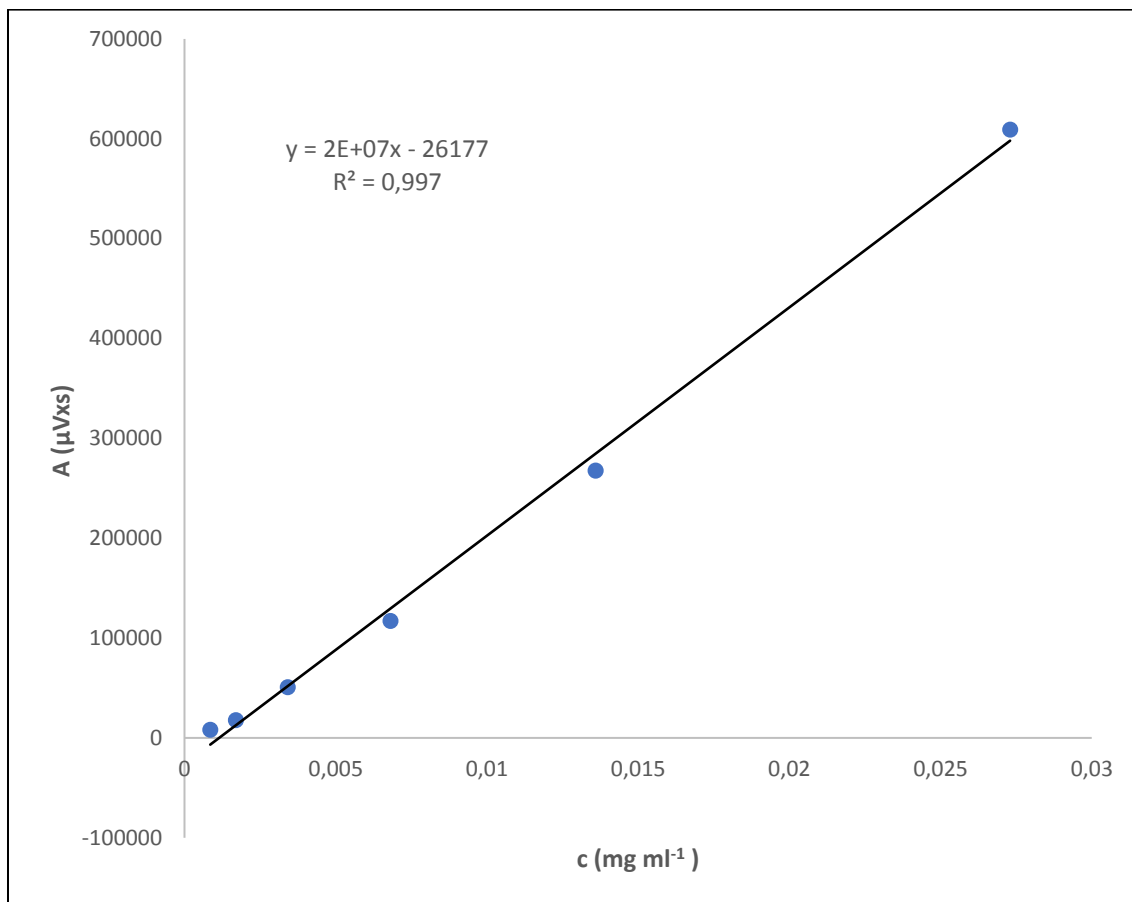
### 3.1.2 Kalibračné závislosti

Po vyvinutí danej metódy bola kalibrácia uskutočnená premeraním kalibračných roztokov o koncentráciách  $28,3 \cdot 10^{-3}$ ,  $14,1 \cdot 10^{-3}$ ,  $7,06 \cdot 10^{-3}$ ,  $3,53 \cdot 10^{-3}$ ,  $1,77 \cdot 10^{-3}$ ,  $8,83 \cdot 10^{-4}$ ,  $4,42 \cdot 10^{-4}$  mg ml<sup>-1</sup>. Po premeraní vzoriek bola zostrojená kalibračná závislosť hodnôt signálu pre plochu píku na koncentrácií daného kalibračného roztoku. Body boli preložené regresnou priamkou a bol vypočítaný korelačný koeficient. Korelačný koeficient pre MeOH odpovedá hodnote 0,9998 a pre PBS 0,9970 (viď obrázok 9,10). Smernica je pre každú závislosť iná z dôvodu použitia inej matrice a preto dôjde k solvatochromným efektom, pri ktorých dôjde ku zmene farby zlúčeniny, ktorá súvisí so zmenou absorpčného spektra molekúl pri rozpustení v rôznych rozpúšťadlách.



Obrázok 9: Kalibračná závislosť hodnôt plochy píku na koncentrácií daného kalibračného roztoku. Podmienky merania: Kinetex C18 100A (50x2,1 mm; 1,3 $\mu$ m), mobilná fáza zmes pufru (10mM mravčan amónny) s prídavkom 0,5% TFA o pH 3,51 a ACN, dávkovaný objem vzorky bol 5  $\mu$ l, prietok mobilnej fáze bol 0,300 ml/min, teplota kolóny bola 30°C a teplota autosempleru bola 15 °C, vlnová dĺžka detekcie: 341 nm. Roztok bol riedený roztokom kyseliny askorbovej rozpustenej v MeOH.





Obrázok 10: Kalibračná závislosť hodnôt plochy píku na koncentrácií daného kalibračného roztoku. Podmienky merania: Kinetex C18 100A (50x2,1 mm; 1,3 $\mu m$ ), mobilná fáza zmes pufru (10mM mravčan amónny) s prídavkom 0,5% TFA o pH 3,51 a ACN, dávkovaný objem vzorky bol 5  $\mu l$ , prietok mobilnej fáze bol 0,300 ml/min, teplota kolóny bola 30°C a teplota autosempleru bola 15 °C, vlnová dĺžka detekcie: 341 nm. Roztok bol riedený roztokom kyseliny askorbovej rozpustenej v PBS.

### 3.2.2 Medz detekcie a medz kvantifikácie

Medz detekcie odpovedá koncentrácií, pre ktorú je analytický signál štatisticky významne odlišný od šumu. Medz stanoviteľnosti odpovedá koncentrácií, pri ktorej je presnosť stanovenia taká, že dovoľuje kvantitatívne vyhodnotenie. LOD a LOQ sa vypočítajú nasledujúcimi vzťahmi:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot h_n}{m}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot h_n}{m}$$

Kde  $h_n$  je šum na základnej línii a  $m$  je smernica kalibračnej krivky.

Ak chceme znížiť LOD a LOQ musíme zvýšiť pomer signálu výška píku/šum. Inak povedané, čím vyššia bude výška píku a čím nižší bude šum, tým dostaneme nižšie hodnoty LOD a LOQ.

Do vyššie zmienených vzorcov boli použité dva parametre a to smernica regresnej priamky z kalibračnej závislosti hodnôt signálu pre výšku píku na koncentrácií daného kalibračného roztoku a šum základnej línii. Šum bol vyhodnotený z chromatogramu slepého vzorku a bol odčítaný v rozmedzí retenčných časov od 4,50 do 5,50 min. Hodnoty LOD pre PBS odpovedala  $1,05 \cdot 10^{-4}$ , pre MeOH  $3,00 \cdot 10^{-5}$  mg ml<sup>-1</sup> a hodnoty LOQ odpovedali  $3,5 \cdot 10^{-4}$  mg ml<sup>-1</sup> pre PBS a  $1 \cdot 10^{-4}$  mg ml<sup>-1</sup> pre MeOH.

#### 4. Záver

V tejto práci bola vyvinutá metóda na stanovenie rifampicínu pomocou UHPLC s DAD detekciou. Táto metóda bude slúžiť ku stanoveniu rifampicínu uvoľňovaného z impregnovaného kolagenového krytia pri in-vitro testoch. Optimálne chromatografické podmienky poskytujúce symetrický a úzsky pík boli separačný systém s reverznými fázami, bola vybraná vhodná kolóna Kinetex C18 100A (50x2,1mm; 1,3 $\mu$ m), zloženie mobilnej fázy 10mM vodný roztok pufru mravčanu amónneho (o pH 3,51), do ktorého bola pridaná kyselina trifluóoctová (0,5%) ako iontopárové činidlo a z ACN, prietoková rýchlosť bola 0,300 ml/min. Meranie prebiehalo v režime gradientovej elúcie mobilnej fázy (čas: 0-1-6-7-8-11, zložka B: 30,30,80,80, 30,30). Dávkované množstvo vzorky bolo 5 $\mu$ l, teplota kolóny 30°C, vlnová dĺžka detekcie 341 nm. Hodnoty LOD pre PBS odpovedala  $1,05 \cdot 10^{-4}$ , pre MeOH  $3,00 \cdot 10^{-5}$  mg ml<sup>-1</sup> a hodnoty LOQ odpovedali  $3,5 \cdot 10^{-4}$  mg ml<sup>-1</sup> pre PBS a  $1 \cdot 10^{-4}$  mg ml<sup>-1</sup> pre MeOH.

## Bibliografia

[1] *RIFAMPICIN Sigma Prod. No. R3501*. [online]

Dostupné z:

[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/r3501pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/r3501pis.pdf)

[Cit. 20.04. 2019]

[2] Rifampicin. Wikipedia [online]

Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Rifampicin>

[Cit. 20.04. 2019]

[3] Lincová, D.; Hassan F.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a preprac. vyd. Praha: Galén, 2007.

[4] Smith, I. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews* **16**, 463–496 (2003).

[5] Mycobacterium tuberculosis. *Wikipedia* [online]

Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium\\_tuberculosis](https://cs.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_tuberculosis)

[cit. 28.2.2019].

[6] Heemskerk D.; Caws M.; Marais B.: Clinical Manifestations. *Tuberculosis in Adults and Children*. London: Springer; 2015.

[7] Le Guellec, C., Gaudet, M. L., Lamanetre, S. & Breteau, M. Stability of rifampin in plasma: consequences for therapeutic monitoring and pharmacokinetic studies. *Ther Drug Monit* **19**, 669–674 (1997).

[8] Chen, Y.: The solubility enhancement and the stability assessment of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in aqueous media. [online]

[Cit. 15.02.2019].

- [9] *UHPLC in life sciences*. (RSC Publ., Royal Soc. of Chemistry, 2012).
- [10] McNeff, C. V., Yan, B., Stoll, D. R. & Henry, R. A. Practice and theory of high temperature liquid chromatography. *Journal of Separation Science* **30**, 1672–1685 (2007).
- [11] Pacáková V.; Štulík K.. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, 1.vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. s. 144.
- [12] *Český lékopis 2009. Díl 3: Evropská část, národní část*. (Grada Publ, 2009)
- [13] <http://chromservis.cz/group/uhplc?lang=CZ> [online]
- [cit. 3.02.2019]
- [14] Churáček J., Jandera J., P.: Separace látek: kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie. 1. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981. s. 140.
- [15] McNeff, C. V., Yan, B., Stoll, D. R. & Henry, R. A. Practice and theory of high temperature liquid chromatography. *Journal of Separation Science* **30**, 1672–1685 (2007).
- [16] Nováková L., Douša M. : Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., Praha, 2013, 49 – 243 s.
- [17] Cvačka, J. : Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc1.pdf>.
- [Cit. 18.02.2019]
- [18] Chromatography/UHPLC [online]
- Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/g/uhplc>
- [Cit. 18.02.2019].

[19] Acquity UPLC Columns [online]

Dostupné z : [https://www.waters.com/waters/en\\_SK/ACQUITY-UPLC-%20Columns/nav.htm?locale=en\\_SK&cid=513206](https://www.waters.com/waters/en_SK/ACQUITY-UPLC-%20Columns/nav.htm?locale=en_SK&cid=513206)

[Cit. 18.02.2019].

[20] Pružinská, K.: Vývoj UHPLC metódy pre separáciu ôsmich štruktúrne blízkych derivátov vitamínu E. (Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, 2018)

[21] Sorbenty UPLC [online]

Dostupné z: [http://www.hplc.cz/uplc/sorbent\\_uplc.html](http://www.hplc.cz/uplc/sorbent_uplc.html)

[Cit. 18.02.2019].

[22] Harahap, Y., Amalia, G. A. & Maggadani, B. P. Analysis of Rifampicin in Dried Blood Spots Using High Performance Liquid Chromatography. *Asian Journal of Scientific Research* **11**, 232–239 (2018).

[23] Temova Rakuša, Ž. *et al.* Fast and Simple LC-MS/MS Method for Rifampicin Quantification in Human Plasma. *International Journal of Analytical Chemistry* **2019**, 1–7 (2019).

[24] Validation of a simple isocratic HPLC-UV method for rifampicin and isoniazid quantification in human plasma. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **8**, 93–99 (2018).

[25] Srivastava, A., Waterhouse, D., Ardrey, A. & Ward, S. A. Quantification of rifampicin in human plasma and cerebrospinal fluid by a highly sensitive and rapid liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **70**, 523–528 (2012).

- [26] Tatarczak, M. ,Flieger, Jolanta , Szumiło, H.: High-performance liquid-chromatographic determination of rifampicin in complex pharmaceutical preparation and in serum mycobacterium tuberculosis-infected patients. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. **62**. 251-256. (2005).
- [27] Kumari, M., Kasthuri, J., Babu, B., Satyanarayana, P. & Tchaleu, B. A Validated Liquid Chromatographic Method for the Determination of Rifampicin and Isoniazid in Pharmaceutical Formulations. *British Journal of Pharmaceutical Research* **7**, 299–307 (2015).
- [28] Kumar, A.K., Chandra, I., Geetha, R.R., Chelvi, K.S., Lalitha, V., & Prema, G: A validated high-performance liquid chromatography method for the determination of rifampicin and desacetyl rifampicin in plasma and urine. . *Tuberculosis Research centre*. **36**. 231-233. (2004).
- [29] Brabcová I. : Využití moderních chromatografických přístupů a úprav vzorků v analýze biologicky aktivních látek, Dizertačná práce, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova (2013)
- [30] Srivastava, A., Waterhouse, D., Ardrey, A. & Ward, S. A. Quantification of rifampicin in human plasma and cerebrospinal fluid by a highly sensitive and rapid liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **70**, 523–528 (2012)
- [31] Liu, J., Sun, J., Zhang, W., Gao, K., & He, Z.: HPLC determination of rifampicin and related compounds in pharmaceuticals using monolithic column. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **46** (2), 405-9 . (2008).
- [32] Swamy N., Basavaiah K., Vamsikrishna P., Krishnamurthy G.: Development and validation of a stability-indicating ultra-performance liquid chromatographic method for the determination of rifampicin in bulk drug and capsules. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. **39** (2) 41-48 (2015).